

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 576 842 A2**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 93108775.3

(51) Int. Cl.⁵: **C12Q 1/68**, C07K 15/28,
G01N 33/569, //(C12Q1/68,
C12R1:01)

(22) Anmeldetag: 01.06.93

(30) Priorität: 11.06.92 DE 4219111
25.11.92 DE 4239567

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.01.94 Patentblatt 94/01

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LI NL

(71) Anmelder: **MERCK PATENT GmbH**
Postfach,
Frankfurter Strasse 250
D-64271 Darmstadt(DE)

(72) Erfinder: **Goebel, Werner, Prof.Dr.**
Ravensburgstrasse 2B
W-8707 Veitshöchheim(DE)
Erfinder: **Bubert, Andreas**
Am Happach 34
W-8708 Gerbrunn(DE)
Erfinder: **Köhler, Stefan, Dr.**
394 Avenue Du Belvedere
F-34980 St. Clément(FR)
Erfinder: **Pawelzik, Martina, Dr.**
Gustav-Heinemann-Ring 57
D-81739 München(DE)
Erfinder: **Hofmann, Gottfried, Dr.**
Graupnerweg 53
W-6100 Darmstadt(DE)
Erfinder: **Neumann, Siegfried, Dr.**
Battenbergstrasse 11
W-6100 Seeheim-Jugenheim(DE)
Erfinder: **Schubert, Peter, Dr.**
Jahnstrasse 127
W-6100 Darmstadt(DE)
Erfinder: **Linxweiler, Winfried, Dr.**
Bahnhofstrasse 48
W-6114 Gross-Umstadt(DE)
Erfinder: **Burger, Christa, Dr.**
Jahnstrasse 124
W-6100 Darmstadt(DE)

(54) Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien.

(57) Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria, insbesondere von L. monocytogenes. Zu den erfindungsgemäßen Mitteln gehören Primer, deren Sequenz aus dem iap-Gen von L. monocytogenes ausgewählt ist. Weiterhin gehören zu den erfindungsgemäßen Mitteln Peptide, deren Sequenz aus dem p60-Protein ausgewählt ist, und die geeignet sind, spezifische Antikörper für den immunologischen Nachweis von L. monocytogenes zu erzeugen.

EP 0 576 842 A2

Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere von *L. monocytogenes*.

Die Mitglieder der Gattung *Listeria* sind grampositive stäbchenförmige Bakterien, die ubiquitär vorkommen. Zu dieser Gattung gehören sieben verschiedene Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. murrayi* und *L. grayi*. Von diesen ist nur *L. monocytogenes* pathogen für Menschen, gefährdet sind insbesondere Neugeborene, Schwangere und Ältere, sowie Patienten unter Immunsuppression. Häufig verlaufen Infektionen mit *L. monocytogenes* tödlich.

Die Ursache für Infektionen mit Listerien sind häufig kontaminierte Lebensmittel, in denen sich die Keime selbst bei niedrigen Temperaturen (um 4°C) vermehren können. So wurden verschiedene Listerien-Epidemien auf den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln, wie z.B. Rohmilch, Käse oder Krautsalat, zurückgeführt. Schnelle Nachweisverfahren für den Nachweis von Listerien, insbesondere in Lebensmitteln oder klinischen Proben, sind also dringend erforderlich. Diese Verfahren müssen zudem zwischen *L. monocytogenes* und den nicht-humanpathogenen Arten unterscheiden können. Weiterhin ist erforderlich, daß alle Varianten der humanpathogenen Art *L. monocytogenes* nachgewiesen werden können.

In jüngster Zeit wird in der Fachwelt diskutiert, ob die Listerienart *L. innocua* als Leitkeim für das mögliche Vorkommen von *L. monocytogenes* sinnvoll eingesetzt werden könnte. Deswegen wäre auch ein Nachweis von *L. innocua* nützlich.

Der Nachweis von *L. monocytogenes* erfolgt bisher mittels Verfahren, die auf der Kultur der Mikroorganismen beruhen. Das in Int. J. Food Microbiol. 4 (1987), 249-256 beschriebene Verfahren dauert zwei Wochen. Ein etwas schnelleres Verfahren wird von der International Dairy Foundation (IDF) empfohlen; es dauert aber mindestens 6-8 Tage. Beide Verfahren sind wegen ihrer Dauer für eine schnelle Identifizierung ungeeignet. Beide Verfahren sind zudem arbeitsintensiv, da für die Gewinnung von Einzelkolonien Nährmedien mehrfach inokuliert werden müssen, und da anschließend die Isolate mittels biochemischer und serologischer Untersuchungsmethoden charakterisiert werden müssen.

Die bisher auf dem Markt befindlichen immunologischen Tests dauern zwar nur wenige Stunden, erlauben jedoch nicht die wichtige Unterscheidung zwischen verschiedenen Arten von Listerien. Auch bei diesen Verfahren wird eine zweitägige Voranreicherungskultur benötigt.

In Appl. Environ. Microbiol. 54 (1988), 2933-2937 ist eine Methode beschrieben, bei der *L. monocytogenes* mit Hilfe von synthetischen Oligodesoxyribonukleotid-Sonden spezifisch nachgewiesen wird. Jedoch sind die verwendeten Sonden nicht ausreichend spezifisch, da sie auch mit der nicht human-pathogenen Art *L. seeligeri* reagieren. Auch für dieses Verfahren ist eine vorherige Vermehrung der Keime notwendig: Lebensmittelproben bzw. deren Verdünnungen werden auf Agarplatten ausgestrichen, die beimpften Platten werden bebrütet und anschließend mit einer radioaktiv markierten DNS-Sonde im colony Hybridisierungsverfahren untersucht. Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie. Auch diese Methode ist arbeits- und zeitaufwendig.

In Infect. Immun. 58, 1943-1950 (1990) wird die DNA-Sequenz des iap-Gens (invasion-associated protein) von *L. monocytogenes* beschrieben. Dieses Gen kodiert ein Protein, das auch unter der Bezeichnung p60 bekannt ist, und das in Varianten in allen *Listeria* Arten vorkommt. Bei *L. monocytogenes* ist dieses Protein für die Fähigkeit der Bakterien, in tierische Zellen einzudringen, verantwortlich. Ein Polynukleotid (400 Basen) mit einer Teilsequenz aus diesem Gen ist als DNA-Sonde geeignet, um *L. monocytogenes* von anderen Organismen zu unterscheiden.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction: PCR) erlaubt die in-vitro Vermehrung von Nukleinsäuren, eine Vorkultur ist bei diesem Verfahren im allgemeinen nicht notwendig. Damit die Reaktion gestartet werden kann, werden kurze Nukleinsäurestücke (primer) benötigt, die den zu vermehrenden Genabschnitt eingrenzen. Üblicherweise werden zwei Primer benutzt, die mit jeweils einem Nukleinsäurestrang hybridisieren. Einer der Primer besitzt deswegen die Komplementärsequenz des jeweiligen Genabschnittes. Die Auswahl dieser Primer bestimmt die Spezifität der Nachweisreaktion. Für den Nachweis von *L. monocytogenes* ist dieses Verfahren in Appl. Environmental Microbiology 57, 606-609 (1991), in Letters Appl. Microbiol. 11, 158-162 (1990) und in J. Appl. Bact. 70, 372-379 (1991) beschrieben. Dort finden sich nähere Angaben zu den Einzelheiten dieser Verfahren. Die DNA-Primer binden an das Gen für Listeriolysin, dem *Listeria*-Hämolysin. Die Spezifität dieser Primer ist, wie aus Anmerkungen in J. Appl. Bact. 70 hervorgeht, zumindestens unsicher: *L. seeligeri* läßt sich nicht sicher von *L. monocytogenes* unterscheiden. Mit Hilfe der bisher beschriebenen Primer in der PCR-Technik ist somit der sichere Nachweis von *L. monocytogenes* bisher nicht möglich.

Polyklonale Antikörper gegen *L. monocytogenes* p60 reagieren auch mit dem Protein p60 von anderen, apathogenen Listerienarten. Derartige Antikörper sind deswegen ungeeignet, *L. monocytogenes* durch immunologische Verfahren spezifisch nachzuweisen. Es ist zwar prinzipiell möglich, ein derartiges polyvalentes Antiserum durch spezifische Absorption von störenden Antikörperfraktionen zu reinigen: Dazu müßte

gegebenenfalls Protein p60 von allen anderen *Listeria*-Arten an Träger kovalent gebunden werden. Die nicht erwünschten Antikörperfraktionen lassen sich spezifisch absorbieren; übrig bleibt ein Antiserum, das nur noch mit Protein p60 aus *L. monocytogenes* reagiert. Diese Methode zur Gewinnung eines für *L. monocytogenes* spezifischen Serums ist aufwendig: Man benötigt erhebliche Mengen von dem polyvalenten Antiserum als Ausgangsmaterial, sowie zusätzlich die iap-Genprodukte p60 von verschiedenen *Listeria*-Arten. Bei der Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen Protein p60 würde dieser hohe Materialbedarf nicht auftreten, jedoch ist die Entstehung von Antikörpern gegen bestimmte Epitope zufallsbedingt: Zunächst muß eine große Zahl von antikörperproduzierenden Zellklonen hergestellt werden, aus denen dann Klone mit geeigneten Antikörpern ausgewählt werden müssen. Es ist bisher nicht möglich, gezielt Antikörper gegen Epitope zu gewinnen, die für *L. monocytogenes* spezifisch sind. Ähnliches gilt für Antikörper gegen Epitope, die für *L. innocua* spezifisch sind.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, verbesserte Mittel und Methoden für die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere für den Nachweis von Bakterien der Art *L. monocytogenes* bereitzustellen. Insbesondere werden erfindungsgemäß für die PCR-Technik geeignete Primer-Sequenzen, sowie Peptide zur gezielten Erzeugung von spezifischen Antikörpern, die für den artspezifischen immunologischen Nachweis von Bakterien der Arten *L. monocytogenes* und *L. innocua* geeignet sind, bereitgestellt.

Gegenstand der Erfindung sind Primer, ausgewählt aus dem iap-Gen, für die Amplifikation von Nukleinsäuren, beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer als Teilsequenz mindestens eine Sequenz nach einer der Formeln Ia bis Ih und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu 20 weitere Nukleotidbausteine gebunden vorliegen können. Derartige Primer sind geeignet für den Nachweis und die Differenzierung von Bakterien der Gattung *Listeria*, insbesondere auch der Art *L. monocytogenes* mittels PCR.

AATATGAAAAAGC Ia
 25 GCTTCGGTCGCGTA Ib
 ACAGCTGGGATTGC Ic
 ACTGCTAACACAGCT Id
 TAACAGCAATTCAAG Ie
 CTGAGGTAGCGAGC If
 30 AGCACTCCAGTTGTTA Ig
 GCAGTTTCTAACCT Ih

Besonders bevorzugt sind dabei Primer, die eine Sequenz nach einer der Formeln IIa bis IIh und/oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

GTCGACTGAATATGAAAAAGCAAC IIa
 35 TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA IIb
 GCTACAGCTGGGATTGCGGT IIc
 CAACTGCTAACACAGCTACT IId
 CAATAACAGCAATTCAAGTGC IIe
 TAACTGAGGTAGCGAGCGAA IIIf
 40 ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC IIg
 CCAGCAGTTTCTAACCTGCT IIh

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Peptide, die als Teilsequenz mindestens eine Sequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIIi enthalten, wobei vor und/oder hinter dieser Teilsequenz bis zu jeweils sieben Aminosäuren peptidisch gebunden vorliegen können.

45 ProValAlaProThrGln IIIa
 ThrGlnAlaThrThrProAla IIIb
 AlalleLysGlnThrAlaAsnThrAla IIIc
 GlnGlnThrAlaProLysAlaProThr IIId
 ValAsnAsnGluValAlaAlaAlaGluLysThrGlu IIIf
 50 ThrProValValLysGlnGluValLys IIIf
 ValLysGlnProThrThrGlnGlnThrAlaPro IIIf
 IleLysGlnProThrLysThrValAlaPro IIIf
 GlnGlnThrThrThrLysAlaProThr IIIf

Besonders bevorzugt sind dabei Peptide mit einer Sequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i, sowie nach einer der Abbildungen 5 a-d.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung eines der genannten Peptide mit einer Teilsequenz nach einer der Formeln IIIa bis IIIi zur Herstellung von immunogenen Konjugaten. Besonders bevorzugt sind für diesen Verwendungszweck Peptide mit einer Sequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i, sowie nach

einer der Abbildungen 5 a-d.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Antikörper, der ein Epitop bindet, das von dem Polypeptid nach Abbildung 3 gebildet wird, oder das ein Peptid nach einer der Formeln IIIa - IIIi, bevorzugt nach einer der Abbildungen 2 a-i, sowie nach einer der Abbildungen 5 a-d, enthält.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Antikörper, herstellbar durch Immunisierung eines Versuchstieres mit einem Polypeptid nach Figur 3 oder mit einem immunogenen Konjugat, welches ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthält.

- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, indem man ein Versuchstier mit einem Immunogen immunisiert und die
10 Antikörper isoliert, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein Polypeptid nach Fig. 3 oder ein immunogenes Konjugat, das ein Polypeptid nach Fig. 3 enthält, verwendet. Bevorzugt sind dabei immunogene Konjugate, die ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthalten, oder die ein Peptid nach einer der Formeln IVa-IVi enthalten, worin

- X³ und X⁴ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, eine beliebige Aminosäure oder ein beliebiges
15 Oligopeptid mit bis zu 7 Aminosäuren bedeuten.

- X³ProValAlaProThrGlnX⁴ IVa
X³ThrGlnAlaThrThrProAlaX⁴ IVb
X³AlaIleLysGlnThrAlaAsnThrAlaX⁴ IVc
20 X³GlnGlnThrAlaProLysAlaProThrX⁴ IVd
X³ValAsnAsnGluValAlaAlaAlaGluLysThrGluX⁴ IVe
X³ThrProValValLysGlnGluValLysX⁴ IVf
X³ValLysGlnProThrThrGlnGlnThrAlaProX⁴ IVg
X³IleLysGlnProThrLysThrValAlaProX⁴ IVh
25 X³GlnGlnThrThrThrLysAlaProThrX⁴ IVi

Besonders bevorzugt sind dabei Peptide mit einer Sequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i, sowie nach einer der Abbildungen 5 a-d.

- Gegenstand der Erfindung ist schließlich die Verwendung eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia - Ih oder bevorzugt eine Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder eine
30 zugehörige Komplementärsequenz enthält, für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels eines Primers, der eine Teilsequenz nach einer der Formeln Ia - Ih oder bevorzugt eine Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthält.

- Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein Epitop aus
35 der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist, oder der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i oder 5 a-d gerichtet ist, für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.

- Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels eines Antikörpers, der gegen ein Epitop aus der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist, oder
40 der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i oder 5 a-d gerichtet ist.

- Gegenstand der Erfindung sind schließlich Testzusammenstellungen zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria, insbesondere der Art *L. monocytogenes*, mittels Amplifikation von Nukleinsäuren, beispielsweise mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion, die einen Primer mit einer Teilsequenz nach einer der
45 Formeln Ia - Ih oder bevorzugt mit einer Sequenz nach einer der Formeln IIa - IIh oder eine zugehörige Komplementärsequenz enthalten.

- Gegenstand der Erfindung sind ferner Testzusammenstellungen zum immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes*, in denen ein Antikörper, der gegen ein Epitop aus der Polypeptidsequenz nach Figur 3 gerichtet ist, oder der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 2 a-i gerichtet ist, enthalten ist, sowie Testzusammenstellungen zum
50 immunologischen Nachweis von Bakterien der Art *Listeria innocua*, in denen ein Antikörper, der gegen eines der Epitope mit einer Aminosäuresequenz nach einer der Abbildungen 5 a-d gerichtet ist, enthalten ist.

- Figur 1 zeigt das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung von Amplifikationsprodukten; die
55 experimentellen Einzelheiten sind in Beispiel 8 dargestellt.

Figur 2 a-i zeigen die Aminosäuresequenzen der besonders bevorzugten immunogenen Peptide ausgewählt aus der Sequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes*.

Figur 3 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptides ausgewählt aus der Sequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes*, dessen Epitope für den immunologischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* geeignet sind.

Figur 4 zeigt für Vergleichszwecke die Aminosäuresequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes*, die in zwei Teilabbildungen a und b dargestellt ist.

Figur 5 a-d zeigen die Aminosäuresequenzen der besonders bevorzugten immunogenen Peptide ausgewählt aus der Sequenz des Proteins p60 aus *Listeria innocua*.

Die Erfindung wird im folgenden näher beschrieben. Dabei wird in der Regel auf Einzelheiten von biochemischen, immunologischen und molekularbiologischen Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, und deren Einzelheiten in der Literatur beschrieben sind, nicht näher eingegangen. Bei diesen Verfahren kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher beschriebenen Varianten Gebrauch machen.

Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide nach den Formeln Ia - Ih und IIa - IIh sind als Primer für Nukleinsäureamplifikationsmethoden und somit zum spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria* geeignet. Ihre Sequenzen sind in üblicher Weise vom 5'-Ende zum 3'-Ende geschrieben dargestellt. In Abhängigkeit von den Erfordernissen des jeweils verwendeten Amplifikationssystems werden entweder Desoxyribonukleotide oder auch Ribonukleotide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen eingesetzt. Im letzteren Fall sind die Thymidinbausteine jeweils durch Uridinbausteine ersetzt. Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, daß häufig der Austausch von einer oder weniger Basen in einer Nukleotidsequenz deren biologische Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen auch solche, die durch Basenaustausch aus den Sequenzen Ia - Ih und IIa - IIh abgeleitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie der jeweilige Primer mit der Ursprungssequenz zeigen. Da üblicherweise je ein Primer mit jeweils einem der DNA-Stränge reagieren soll, wird einer der Primer in der komplementären Sequenz eingesetzt. Die komplementäre Sequenz ergibt sich in bekannter Weise nach den Regeln der Basenpaarung.

Basierend auf der jeweiligen Sequenz können die erfindungsgemäßen Oligonukleotide nach dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise der Phosphotriester- oder der Phosphoamidit-Methode, synthetisiert werden. Bevorzugt wird die Phosphoamidit-Methode benutzt, insbesondere unter Verwendung von mechanisierten Synthetizern. Die Methode ist in Tetrahedron Lett. (1981) 22 : 1859-1862 beschrieben. Weitere Einzelheiten derartiger Syntheseverfahren sind beispielsweise in Winnacker, E.L. (1985) Gene und Klone, Seite 44-61 (VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim), beschrieben.

Die erfindungsgemäßen Primer sind geeignet für DNS-Amplifikation, beispielsweise mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR). Dazu wird die DNS durch Erwärmen zunächst in die Einzelstränge zerlegt. Es werden zwei Primer verwendet, die jeweils mit dem homologen DNS-Abschnitt auf jeweils einem DNS-Strang hybridisieren. Der Genomabschnitt, der zwischen diesen beiden Primern liegt, wird vermehrt. Die an die DNS angelagerten Primer stellen die Startpunkte für die Amplifikation dar. Eine Polymerase, bevorzugt taq-DNA-Polymerase, ergänzt anschließend in Gegenwart der vier Nukleotidtriphosphate den zweiten Strang entsprechend der Sequenz der ursprünglichen DNA. Anschließend werden die entstandenen Doppelstränge wieder durch Erwärmen in die Einzelstränge zerlegt. Dieser Amplifikationszyklus kann mehrfach wiederholt werden. Nach einer ausreichenden Anzahl von Amplifikationszyklen kann die amplifizierte Nukleinsäure mittels bekannter Methoden nachgewiesen werden. Dazu kann die DNS mittels Elektrophorese aufgetrennt, anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und schließlich durch Fluoreszenz mittels UV-Anregung nachgewiesen werden. Möglich ist auch der Nachweis mittels DNS-Hybridisierung. Die Einzelheiten geeigneter Amplifikations- und Nachweismethoden sind auch in Übersichtsartikeln, z.B. Innis et al. (eds.) PCR Protocols (Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publishers) beschrieben. Ebenso sind andere Nukleinsäureamplifikationsverfahren, bei denen die erfindungsgemäßen Primer benutzt werden können, aus der Literatur bekannt. Zu diesen gehört die Ligase-Ketten-Reaktion, beschrieben von Bond, S. et al. (1990), Seite 425-434 bei Raven Press (New York, NY/USA).

Die Auswahl der Primer nach den bevorzugten Formeln IIa - IIh bestimmt die Lage der Startpunkte auf dem iap-Gen und somit die Spezifität der Nachweisreaktion: So erwiesen sich Kombinationen von Primern ausgewählt aus der Sequenz des ia-Gens als unspezifisch und folglich ungeeignet für den Nachweis von *Listerien* mittels DNA-Amplifikation (siehe dazu beispielsweise Spalte F in Tabelle 1). Jedoch erwiesen sich andere ausgewählte Kombinationen als spezifisch für die Gattung *Listeria*, andere für Gruppen von *Listeria*-Arten, wieder andere für einzelne *Listeria*-Arten. Insgesamt ist die Auswahl und die Zusammenstellung der Primer also kritisch. Die Auswahl eines der beiden Primer ist stets besonders kritisch, während der zweite Primer eher variiert werden kann, ohne die Spezifität der Nachweisreaktion nennenswert zu verändern. Folglich kann nach der Lehre der vorliegenden Erfindung für diesen zweiten Primer durchaus auch eine Sequenz gewählt werden, die nicht einer der Formeln Ia - Ih oder IIa - IIh entspricht.

Erfindungsgemäß wird zumindestens einer der Primer aus den Formeln Ia - Ih oder bevorzugt aus den Formeln IIa - IIh ausgewählt. Der zweite Primer beeinflusst, wie bereits erläutert, die Spezifität der Amplifikationsreaktion wesentlich weniger als der erste Primer. Bevorzugt werden jedoch Kombinationen, bei denen beide Primer aus den Formeln Ia - Ih oder IIa - IIh ausgewählt werden. Beispiele für derartige bevorzugte Kombinationen sind (typische Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt):

- a) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIc mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von *Listerien* amplifiziert, nicht jedoch die DNS von anderen Bakterienarten (siehe Spalte D in Tabelle 1).
- b) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IId mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von *L. monocytogenes* amplifiziert, nicht jedoch die DNS von anderen *Listerien* oder anderen Bakterien (siehe Spalte B in Tabelle 1).
- c) Bei Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIi mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb wird nur die DNS von bestimmten *Listerien*-Arten amplifiziert, nämlich ausschließlich von *L. seeligeri*, *L. welshimiri* und *L. ivanovii*. Mithin ist ein gruppenspezifischer Nachweis möglich (siehe Spalte E in Tabelle 1).
- d) Ein anderes Beispiel für einen gruppenspezifischen Nachweis besteht in der Verwendung einer Kombination eines Primers nach Formel IIh mit einem Primer mit der Komplementärsequenz nach Formel IIb: Es wird nur die DNS von *L. grayi* und *L. murrayi* amplifiziert (siehe Spalte G in Tabelle 1).
- e) Da die Amplifikationsprodukte verschiedener *Listerien*-Arten unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, können durch eine Kombination von mehreren Primern (nach Formeln IId, IIi, IIg und IIh) mit der Komplementärsequenz von Formel IIb mit einer einzigen Polymerasereaktion Bakterien der Gattung *Listeria* differenziert werden. Einzelheiten dieser Weiterentwicklung der Polymerasetechnik sind aus Beispiel 8 ersichtlich (siehe Spalte H in Tabelle 1, sowie Figur 1).

Wie bereits erwähnt, ist es auch möglich, die Amplifikationsprodukte durch Nukleinsäurehybridisierung nachzuweisen. Dazu werden dem Reaktionsansatz nach der Amplifikation geeignete Nukleinsäurestücke (Nukleinsäuresonden) zugesetzt. Diese Nukleinsäuresonden besitzen eine Basensequenz, die ganz oder teilweise komplementär zu dem amplifizierten Genabschnitt ist. Diese Sonden sind außerdem für eine Nachweisreaktion markiert: Sie können radioaktive Isotope enthalten, oder Fluoreszenzmarkierungen tragen, oder auch durch Enzyme markiert sein. Geeignete Markierungsmittel, Methoden zu ihrer Einfügung in die Nukleinsäuresonde und Nachweismethoden sind dem Fachmann bekannt.

Im besonderen kann die Amplifikationsreaktion spezifisch für die Gattung *Listeria* (wie oben unter a) näher beschrieben) oder für eine Gruppe von *Listerien*-Arten (wie oben unter c) und d) beschrieben) ausgelegt sein. Durch Verwendung von Nukleinsäuresonden, die für jeweils eine Art spezifisch sind, kann dann im Reaktionsansatz, das Vorhandensein dieser Arten von *Listerien* erkannt werden. Wenn die Sonden verschiedene Markierungsmittel enthalten, können auch verschiedene Arten nebeneinander nachgewiesen werden. Diese Verfahrensvariante erlaubt also ähnlich der unter e) oben beschriebenen den Nachweis verschiedener *Listerien*-Arten nebeneinander.

Die Verwendung einer Nukleinsäuresonde oder eines Gemisches verschiedener Sonden, die mit Amplifikationsprodukten aller *Listerien*arten reagieren, erlaubt es, die Spezifität der Amplifikationsreaktion zu überprüfen oder ein einheitliches Nachweisreagenz für verschiedene *Listerien*-Arten bereitzustellen.

Die erfindungsgemäßen Peptide nach den Formeln IVa - IVi und nach Abbildung 2 a-i, sowie nach Abbildung 5 a-d können in immunogene Konjugate eingebaut werden. Mit Hilfe dieser Konjugate können Antikörper erzeugt werden, die es ermöglichen, Bakterien der Gattung *Listeria* mit immunologischen Methoden spezifisch nachzuweisen.

Die Positionen der erfindungsgemäßen Peptide in der Gesamtsequenz des Proteins p60 aus *Listeria monocytogenes* sind im folgenden angegeben:

- a) Die Sequenz nach Formel IIIa beginnt mit Prolin an Position 148 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2a, 2e und 2f.
- b) Die Sequenz nach Formel IIIb beginnt mit Threonin an Position 178 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2b und 2h.
- c) Die Sequenz nach Formel IIIc beginnt mit Alanin an Position 243 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befinden sich auch die Peptide nach Fig. 2c und 2i.
- d) Die Sequenz nach Formel IIId beginnt mit Glutamin an Position 292 der p60 Sequenz (Fig. 4b); in dieser Region befindet sich auch das Peptid nach Fig. 2d.
- e) Die Sequenz nach Formel IIIe beginnt mit Valin an Position 71 der p60 Sequenz (Fig. 4a); in dieser Region befindet sich auch das Peptid nach Fig. 2g.

Die Sequenzen der erfindungsgemäßen Peptide nach Abbildung 5 a-d stammen aus der Gesamtsequenz des Proteins p60 aus *Listeria innocua*; gleiches gilt für die mit den Formeln IIIf - IIIi und IVf - IVi

beschriebenen Teilsequenzen.

Dem Fachmann ist bekannt, daß häufig der Austausch von einer oder wenigen Aminosäuren in einem Peptid dessen biologische Eigenschaften nicht verändert. Deswegen umfassen die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen auch solche, die durch Aminosäureaustausch aus den Sequenzen nach Fig. 2 a-i, nach
5 Fig. 5 a-d oder nach Fig. 3 abgeleitet sind, und die biologisch dieselbe Wirkung wie die jeweiligen Peptide mit der Ursprungssequenz zeigen.

Die Auswahl der erfindungsgemäßen Peptide erwies sich als kritisch. Wählt man beispielsweise ein bestimmtes Peptid, das von dem für *L. monocytogenes* spezifischen Genabschnitt kodiert wird, für die Erzeugung von Antikörpern aus, so zeigt übertaschenderweise keines der Antiseren eine Reaktion mit dem
10 p60-Protein.

Basierend auf der Sequenz der Aminosäuren können die Peptide nach dem Fachmann bekannten Verfahren, beispielsweise dem t_{boc} - oder dem f_{moc} -Verfahren (tert.butyloxycarbonyl-, bzw. 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-), synthetisiert werden. Einzelheiten dieser Verfahren sind beispielsweise in *J.Am.Chem.Soc.* **85**, 2149-2154 (1963) und in *Synthetic Polypeptides as Antigens* (van Regenmortel et al.
15 (eds.) Elsevier 1988 (Band 19 der Buchreihe *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*)) beschrieben. Bevorzugt wird das f_{moc} -Verfahren, insbesondere mechanisierte Verfahrensvarianten. Einzelheiten des Verfahrens, sowie geeignete Aminosäureschutzgruppen sind dem Fachmann bekannt.

Peptide sind im allgemeinen nicht geeignet, Antikörper zu erzeugen. Werden Peptide jedoch an hochmolekulare Trägersubstanzen gekoppelt, so entstehen immunogene Konjugate. Die erfindungsgemäßen
20 Peptide lassen sich mit bekannten Trägersubstanzen konjugieren. Dazu gehören Polyäthylenglykole, Serumalbumine, KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin; Hämocyanin von Napfschnecken), Ovalbumin, Glucose-dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* und PPD (purified protein derivative of tuberculin). Bevorzugte Trägersubstanzen sind KLH und Glucosedehydrogenase aus *B. megaterium*.

Außerdem werden zusätzlich häufig Brückenverbindungen (linker) eingesetzt. Dies sind niedermolekula-
25 re organische Verbindungen mit mindestens zwei verknüpfbaren funktionellen Gruppen. Geeignete Verbindungen sind dem Fachmann bekannt; dazu gehören beispielsweise: 1,2-Diaminoethan, Bernsteinsäure, β -Alanin, 1,6-Diaminohexan, 6-Aminocapronsäure, Adipinsäure, Cystein. Bevorzugt wird Cystein als Linker eingesetzt, wobei dieser Aminosäurerest bereits bei der Synthese des Peptides eingebaut wird. Linker, die sowohl eine Amino- als auch eine Carboxylfunktion enthalten (z.B. β -Alanin, 6-Aminocapronsäure oder
30 Cystein), können wahlweise am C- oder N-Terminus des Peptids angeknüpft werden. Zur Herstellung der Bindungen zwischen Peptid und Trägersubstanz werden bevorzugt m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester (MBS) eingesetzt.

Die genannten immunogenen Konjugate dienen dazu, nach bekannten Verfahren in Versuchstieren Antikörper zu erzeugen. Üblicherweise werden für diesen Zweck Säugetiere, beispielsweise Schaf, Ziege,
35 Kaninchen oder Mäuse benutzt. Kaninchen sind für die Erzeugung polyklonaler Antikörper bevorzugt. Es ist aber auch möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen immunogenen Konjugate monoklonale Antikörper herzustellen.

Einzelheiten der immunologischen Verfahren sind dem Fachmann bekannt. Hinweise zur Durchführung dieser Verfahren sind außerdem vielfältig in der Literatur anzutreffen; beispielsweise seien genannt:

- 40 * Antibodies, E. Harlow und D. Lane, Cold Spring Harbor (1988)
- * Woodard, L.F. und Jasman, R.L. (1985) *Vaccine* **3**, 137-144
- * Woodard, L.F. (1989) *Laboratory Animal Sci* **39**, 222-225
- * Handbook of Experimental Immunology (1986) Weir, D.M. et al. eds.; Blackwell Scientific Publications, Oxford, GB

45 Zu diesen Verfahren gehören beispielsweise die Konjugations- und Immunisierungsverfahren, sowie die Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern und auch immunologische Nachweisverfahren. Zu den immunologischen Nachweisverfahren, bei denen erfindungsgemäße Antikörper benutzt werden können, gehören bevorzugt Agglutinationsverfahren, immunometrische Nachweisverfahren, die Immuno-Biot-Verfahren und insbesondere die sandwich-(ELISA)-Verfahren.

50 Der Begriff Antikörper umfaßt erfindungsgemäß sowohl Immunglobuline als auch Antiseren. Es ist dem Fachmann weiterhin bekannt, daß häufig statt eines einzigen Antikörpers, der gegen ein einzelnes Epitop gerichtet ist, eine Mischung von verschiedenen Antikörpern mit verschiedener Spezifität benutzt werden kann. Dadurch resultieren Vorteile, insbesondere bezüglich der Nachweisempfindlichkeit. Dies trifft im besonderen für monoklonale Antikörper, aber auch für andere Antikörper zu, die gegen jeweils ein Epitop
55 gerichtet sind. Entsprechend kann es vorteilhaft sein, mehrere Antikörper, die gegen verschiedene Peptidstrukturen nach den Formeln IIIa - IIIi oder nach einer der Abbildungen 3, 2 a-i oder 5 a-d gerichtet sind, für die erfindungsgemäße Verwendung und/oder die erfindungsgemäßen Verfahren zu kombinieren.

Einzelheiten der Herstellung der erfindungsgemäßen Primer und Peptide, sowie ihrer Verwendung sind aus den folgenden Beispielen ersichtlich. Weitere methodische Einzelheiten entnimmt der Fachmann der zitierten Literatur. Die Beispiele sollen den Gegenstand der Erfindung illustrieren und stellen keine Einschränkung der Erfindung dar.

5

Beispiele:

Beispiel 1: Herstellung des Primers nach Formel IIa

10 Der Primer nach Formel IIa wird mit dem DNA-Synthesizer 380A von Applied Biosystems nach der Phosphoramidit-methode hergestellt. Die Grundzüge der Methode ist in Tetrahedron Lett. (1981) 22 : 1859-1862, beschrieben. Weitere Einzelheiten finden sich in der Dokumentation des Geräteherstellers.

Entsprechend werden die Primer nach Formel IIc, IId, IIe, IIg und IIh hergestellt. Die Primer nach Formel IIb und IIe werden in der jeweiligen Komplementärsequenz (IIb: TTGGCTTCGGTCGCGTAGAATTCATA; IIe: 15 GCACTTGAATTCGCTGTATTG) hergestellt.

Beispiel 2: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM 20 MgCl₂ und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IId und IIe (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 30 Sekunden auf 55 °C (Bindungsphase) und für eine 25 Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamid-Gel (6%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit 30 Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

Nur wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe vorhanden sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte A in Tabelle 1).

Beispiel 3: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes*

35

Das in Beispiel 2 beschriebene Verfahren wird unter Verwendung der Primer nach Formel IId und IIb (siehe Beispiel 1) anstelle der Primer nach Formel IId und IIe wiederholt. Auch in diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von *L. monocytogenes* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte B in Tabelle 1).

40

Beispiel 4: Durchführung der PCR-Reaktion zum genusspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Listeria*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 45 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIc und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 30 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für zwei Minuten auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

55 In diesem Fall werden PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien der Gattung *Listeria* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte D in Tabelle 1).

Beispiel 5: Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen Nachweis von *Listeria*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIc und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 58 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. welshimeri* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte E in Tabelle 1).

Beispiel 6: Durchführung der PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. innocua*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIg und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 60 Sekunden auf 62 °C (Bindungsphase) und für 45 Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

Nur wenn DNA oder allen von *L. innocua* in der Probe vorhanden sind, werden PCR-Produkte beobachtet (siehe Spalte C in Tabelle 1).

Beispiel 7: Durchführung der PCR-Reaktion zum gruppenspezifischen Nachweis von *Listerien*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Wasser suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend werden Primer nach Formel IIh und IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für 45 Sekunden auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

Die PCR-Produkte werden in einem Agarose-Gel (1 %) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

In diesem Fall werden nur PCR-Produkte beobachtet, wenn DNA oder Zellen von Bakterien aus der Gruppe *L. grayi* und *L. murrayi* in der Probe vorhanden sind (siehe Spalte G in Tabelle 1).

Beispiel 8: Durchführung einer kombinierten PCR-Reaktion zum artspezifischen Nachweis von *L. monocytogenes* und von *L. innocua* und zum gruppenspezifischen Nachweis der Gruppen *L. ivanovii* / *L. seeligeri* / *L. welshimeri* und *L. grayi* / *L. murrayi*

Eine bakterienhaltige Probe mit ca. 1 µg DNA wird in 50 µl Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl) suspendiert und 5 Minuten auf 110 °C erhitzt. Anschließend wird eine Mischung von Primern nach Formel IId, IIc, IIg, IIh, sowie IIb (siehe Beispiel 1; je 0,4 µg), sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fa. Pharmacia), gelöst in Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 1,5 mM MgCl₂ und 50 mM KCl), sowie jeweils 200 µM dGTP, dATP, dTTP und dCTP zugefügt (gesamtes Reaktionsvolumen 100 µl). Der erste

Denaturierungsschritt dauert 3 Minuten bei 94 °C. Anschließend wird für 45 Sekunden auf 56 °C (Bindungsphase) und für eine Minute auf 72 °C (Elongationsphase) temperiert. Die folgenden Denaturierungsschritte (bei 94 °C) dauern 45 Sekunden. Nach 30 Reaktionszyklen wird ein abschließender Elongationsschritt (bei 72 °C) mit 5 Minuten Dauer ausgeführt.

5 Die PCR-Produkte werden in einem Polyacrylamid-Gel (4%) in einem Laufpuffer Tris-Borat (je 50 mM) mit EDTA (2,5 mM) aufgetrennt. Zusätzlich wird eine Nukleinsäuremischung (beispielsweise das Produkt aus der Spaltung von Spp1 Phagen DNA mittels Restriktionsendonuklease *EcoRI*) als Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

10 Anschließend werden die aufgetrennte PCR-Produkte durch Anfärbung mit Ethidiumbromid (0,1 mg/ml in Wasser) angefärbt und Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) sichtbar gemacht.

Das Vorhandensein von DNA oder Zellen von Bakterien aus der Art *L. monocytogenes*, der Art *L. innocua*, der Gruppe *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* oder der Gruppe *L. grayi* / *L. murrayi* kann auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte differenziert werden (siehe Spalte H in Tabelle 1, sowie Figur 1).

15 **Beispiel 9: Synthese des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu**

Für die Synthese des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu wird das f_{moc} -Verfahren (9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Schutzgruppe) benutzt. Dieses Peptid entspricht einem Peptid der Formel IVd mit einem zusätzlichen N-terminalen Cysteinrest als Linker. Für die Synthese wird ein Peptid-Synthetizer der Fa. Applied Biosystems benutzt, die Prozessparameter sind in der Gerätedokumentation enthalten.

20 Ein polymerer Träger mit 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)phenoxygruppen dient als Festphase. Die Aminosäuren werden als α -N- f_{moc} -Derivate eingesetzt. Soweit die Aminosäuren reaktive Seitengruppen enthalten, werden diese durch zusätzliche Schutzgruppen, die durch Trifluoressigsäurehydrolyse abspaltbar sind, maskiert. Die Peptidbindungen werden durch Aktivierung der Carboxylgruppen mittels Diisopropylcarbodiimid hergestellt. Die Reihenfolge der eingesetzten Aminosäurederivate ergibt sich aus der gewünschten Sequenz.

Im ersten Schritt des Synthesesyklus reagiert die Aminogruppe an der Festphase, d.h. im ersten Zyklus die Aminogruppen des 4-(2',4'-Dimethoxyphenylaminomethyl)-phenoxyrests des Trägers, in den folgenden 30 Zyklen die α -Aminogruppe der zuletzt angefügten Aminosäure, mit der Carboxylgruppe der nächsten Aminosäure, die als α -N- f_{moc} -Derivat, gegebenenfalls mit geschützten Seitenketten eingesetzt wird, und die durch Diisopropylcarbodiimid aktiviert wird. Nicht umgesetzte Aminosäurederivate werden mit Dimethylformamid ausgewaschen. Anschließend wird die f_{moc} -Gruppe durch Behandeln mit 20 % (V/V) Piperidin in Dimethylformamid abgespalten. Die übrigen Schutzgruppen bleiben bei dieser Reaktion unverändert. Mit 35 der Entfernung der α -N-Schutzgruppe kann der nächste Reaktionszyklus beginnen. Nachdem die letzte Aminosäure entsprechend der vorgesehenen Sequenz zugefügt worden ist, werden die Schutzgruppen der Seitenketten und die Bindung zum Trägerharz durch saure Hydrolyse mittels Trifluoressigsäure gespalten. Das Peptid wird anschließend durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie gereinigt.

40 Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch die übrigen Peptide mit den erfindungsgemäßen Sequenzen synthetisiert.

Beispiel 10: Konjugation des Peptides CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu mit Glucosedehydrogenase

45 a) Derivatisierung der Glucosedehydrogenase: 30 mg

Glucosedehydrogenase aus *Bacillus megatherium* (Fa. Merck, Art.Nr. 13732) werden in 4 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 8,0) gelöst. Zu 2,4 ml dieser Lösung werden 6,78 mg N-y-Maleimidobutyryloxysuccinimid (Fa. Calbiochem) gelöst in 50 μ l Dimethylsulfoxid zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das überschüssige N-y-Maleimidobutyryloxysuccinimid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia) chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man 3,5 ml Lösung des aktivierten Trägerproteins mit einer Konzentration von 4,5 mg/ml.

50 b) Kopplung mit dem Peptid: Zu 1,1 ml der Lösung aus dem obigen Schritt werden 5,2 mg des Peptides, hergestellt nach Beispiel 9, gelöst in 1 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM; pH 7,0) zugefügt und 3 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird das nicht gebundene Peptid durch Gelfiltration an PD-10 (Fa. Pharmacia) chromatographisch abgetrennt. Nach der Chromatographie erhält man 3,5 ml Lösung des Konjugates mit einer Konzentration von 2,3 mg/ml.

55 Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise werden auch Konjugate mit den anderen Peptiden entsprechend der vorliegenden Erfindung hergestellt.

Beispiel 11: Erzeugung von polyklonalen Antikörpern gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

Zwei Kaninchen werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,18 ml Konjugat aus Beispiel 10, 0,07 ml
 5 phosphatgepufferter Saline und 0,25 ml Ölajuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) i.m. injiziert. Drei, fünf und
 sieben Wochen nach der Erstinjektion erfolgen Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Eine Woche nach
 der letzten Injektion werden die Tiere getötet und ausgeblutet. Nachdem das Blut geronnen ist, wird das
 Antiserum durch Zentrifugation gewonnen und Natriumazid bis zu einer Endkonzentration von 0,02%
 zugefügt. Das Antiserum wird bei -20 °C eingefroren gelagert.

Beispiel 12: Erzeugung von monoklonalen Antikörpern gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu

Zwei Mäuse werden jeweils mit einer Emulsion aus 0,1 ml Konjugat aus Beispiel 10 und 0,1 ml
 15 Ölajuvans (MISA 50, Fa. Seppic, FR) s.c. injiziert. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Erstinjektion
 erfolgen Boosterinjektionen mit gleicher Menge. Drei Tage nach der letzten Injektion werden die Tiere
 getötet und die Milz isoliert. Die Zellen aus der Milz werden nach üblichen Verfahren isoliert und mit einer
 permanenten murinen Zelllinie fusioniert. Aus den Fusionsprodukten werden Zelllinien selektioniert, die
 Antikörper gegen das Peptid CysGlnGlnGlnThrAlaProLysAlaProThrGlu bilden.

Beispiel 13: Immunologischer Nachweis von *L. monocytogenes*

a) Vorkultur und Zentrifugation der Bakterien: 10 ml CASO-Bouillon werden mit Material aus mehreren
 Kolonien von *L. monocytogenes* angeimpft und bei 30°C über Nacht inkubiert. Anschließend wird je 1 ml
 25 der Kultur entnommen. Die Bakterienzellen werden abzentrifugiert (13000 UpM).
 b) Identifizierungsreaktion: Je 300 µl der Überstände aus dem vorigen Arbeitsschritt werden in die
 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wird je
 dreimal mit je 100 µl Waschlösung (9 g/l NaCl und 0,05% Tween 20 in Wasser) gewaschen. In die
 30 Vertiefungen werden nun je 100 µl Antiserum hergestellt nach Beispiel 11 pipettiert und eine Stunde bei
 Raumtemperatur inkubiert. Es wird erneut je dreimal mit je 100 µl Waschlösung gewaschen. Dann
 werden in jede Vertiefung je 100 µl mit alkalischer Phosphatase markierter anti-kaninchen Antikörperlö-
 sung (Art.Nr. A 8025; Fa. Sigma) pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vertiefun-
 gen werden erneut mit je 100 µl Waschlösung gewaschen und anschließend der gebundene enzymmar-
 35 kierte Antikörper nachgewiesen. Dazu werden 200 µl einer Pufferlösung mit Substrat eingefüllt und 30
 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 100 µl 2 N NaOH-Lösung
 (Art.Nr. 9136, Fa. Merck) abgestoppt und das Reaktionsprodukt sichtbar gemacht. Eine gelborange
 Färbung zeigt die Anwesenheit von *L. monocytogenes* an.

Beispiel 14: Spezifischer Nachweis von *L. monocytogenes* mittels Immunoblot

Bakterien werden wie in Beispiel 13a) beschrieben vorkultiviert und die Zellen abzentrifugiert. Die
 abzentrifugierten Zellen werden in 1 ml phosphatgepufferter Saline aufgenommen und suspendiert. 2 µl
 dieser Suspension werden auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C, 0,45 µm, Art.Nr. RPN 283 C, Fa.
 Amersham) pipettiert. Nachdem die Lösung eingetrocknet ist, wird die Membran für eine Stunde bei
 45 Raumtemperatur mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (10 g/l) in phosphatgepufferter Saline behan-
 delt. Es wird eine Verdünnung (1:200) des in Beispiel 11 erhaltenen Antiserums mit einer Lösung von
 Rinderserumalbumin (10 g/l) und Tween 20 (0,5 g/l) in phosphatgepufferter Saline (Antikörperlösung A),
 sowie eine weitere Verdünnung (1:500) von peroxidasemarkiertem anti-Kaninchen Antikörper (anti Rabbit
 IgG, Art.Nr. 68-397; Fa. ICN Immuno Biologicals) mit demselben Verdünnungsmittel (HRP-Antikörperlö-
 50 sung) vorbereitet. Die Membran wird eine Stunde bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung A inkubiert und
 anschließend dreimal mit phosphatgepufferter Saline mit 0,05% Tween 20 gewaschen. Um die Antikörper-
 bindung nachzuweisen, wird die Membran anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit HRP-
 Antikörperlösung inkubiert und je dreimal mit a) Tween 20 (0,5 g/l) in phosphatgepufferter Saline, b) mit
 phosphatgepufferter Saline und c) mit TRIS-Puffer (50 mM; pH 7,4; mit 200 mM NaCl) gewaschen. Für die
 55 Farbreaktion wird eine Lösung von 4-Chloro-1-naphthol (3 mg/ml in Methanol) mit fünf Volumen TRIS-Puffer
 (50 mM; pH 7,4; mit 200 mM NaCl) verdünnt und Wasserstoffperoxid zugesetzt (Endkonzentration 0,1 g/l).
 Die Membran wird in dieser Substratlösung inkubiert. Eine blauschwarze Färbung zeigt *L. monocytogenes*
 an.

Tabelle 1: Spezifität der Polymerase-Ketten-Reaktion bei Verwendung verschiedener Primer entsprechend Formel IIa - IIh

5	Kombination:	A	B	C	D	E	F	G	H
	Primer 1:	IIId	IIId	IIg	IIc	IIIf	IIa	IIh	M ³⁾
	Primer 2:1)	IIe	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb	IIb
10	untersuchte Reaktion								
	Bakterien:								
	L. monocytogenes								
	Serovar 1/2a EGD	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 1/2a Mack. ²⁾	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 1/2b	+	+	-	+	-	+	-	+
15	Serovar 1/2c	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3a	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3b	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 3c	+	+	-	+	-	+	-	+
20	Serovar 4a	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4ab	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4b	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4c	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 4d	+	+	-	+	-	+	-	+
25	Serovar 4e	+	+	-	+	-	+	-	+
	Serovar 7	+	+	-	+	-	+	-	+
	L. ivanovii	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. seeligeri	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. innocua								
30	Serovar 6a	-	-	+	+	-	+	-	+
	Serovar 6b	-	-	+	+	-	+	-	+
	Serovar 4ab	-	-	+	+	-	+	-	+
	L. welshimeri	-	-	-	+	+	+	-	+
	L. murrayi	-	-	-	+	-	+	+	+
35	L. grayi	-	-	-	+	-	+	+	+
	Enterococcus faecalis	-	-	-	-	-	+	-	-
	Bacillus cereus	-	-	-	-	-	+	-	-
	Micrococcus flavus	-	-	-	-	-	+	-	-
40	<u>Legende:</u>								
	+	PCR-Produkt nachgewiesen							
	-	kein PCR-Produkt nachweisbar							
	1)	komplementäre Sequenz							
	2)	Mack.: Stamm Mackaness							
45	3)	M: Mischung aus Primern nach Formel IIId, IIIf, IIg und IIh;							
		Amplifikationsprodukte können auf Grund des							
		Molekulargewichtes differenziert werden.							
50									
55									

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Merck Patent GmbH
(B) STREET: Frankfurter Str. 250
(C) CITY: Darmstadt
(E) COUNTRY: Germany
(F) POSTAL CODE (ZIP): 6100
(G) TELEPHONE: 06151-727840
(H) TELEFAX: 06151-727191
(I) TELEX: 4 19 328 32 em d

(ii) TITLE OF INVENTION: Processes and agents for detecting
listerias

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 16

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: EP

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: DE 4219111
(B) FILING DATE: 11-JUN-1992

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: DE 4239567
(B) FILING DATE: 25-NOV-1992

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 14 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANOEONESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Listeria monocytogenes
(B) STRAIN: Mackaness

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

AATATGAAAA AAGC

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
- (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GCTTCGGTCG CGTA

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 14 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
- (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

ACAGCTGGGA TTGC

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 15 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: Mackaness

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

ACTGCTAACA CAGCT

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 15 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

20

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: Mackaness

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

TAACAGCAAT TCAAG

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

30

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 14 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

40

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: Mackaness

45

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

CTGAGGTAGC GAGC

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

50

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid

55

(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear

5 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
10 (vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:
15 AGCACTCCAG TTGTTA 16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
20 (A) LENGTH: 15 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
25 (iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
30 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:
35 GCAGTTTCTA AACCT 15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
40 (A) LENGTH: 25 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
45 (iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(vi) ORIGINAL SOURCE:
50 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: Mackaness

55

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

GTGCACTGAA TATGAAAAA GCAAC

25

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 26 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
- (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

TTGGCTTCGG TCGCGTAGAA TTCATA

26

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 20 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
- (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

GCTACAGCTG GGATTGCGGT

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 21 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

CAAACGTGCTA ACACAGCTAC T

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 21 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

CAATAACAGC AATTCAAGTG C

21

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 20 base pairs

(B) TYPE: nucleic acid

(C) STRANDEDNESS: double

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

TAACTGAGGT AGCGAGCGAA

20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 22 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

ACTAGCACTC CAGTTGTAA AC

22

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 21 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: Mackaness

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

CCAGCAGTTT CTAAACCTGC T

21

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: Merck Patent GmbH
(B) STREET: Frankfurter Str. 250
(C) CITY: Darmstadt
(E) COUNTRY: Germany
(F) POSTAL CODE (ZIP): 6100
(G) TELEPHONE: 06151-727840
(H) TELEFAX: 06151-727191
(I) TELEX: 4 19 328 32 em d

(ii) TITLE OF INVENTION: Verfahren und Mittel zum Nachweis von
Listerien

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 24

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(v) CURRENT APPLICATION DATA:

APPLICATION NUMBER: EP

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: DE 4219111
(B) FILING DATE: 11-JUN-1992

(vi) PRIOR APPLICATION DATA:

(A) APPLICATION NUMBER: DE 4239567
(B) FILING DATE: 25-NOV-1992

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 6 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Listeria monocytogenes
(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Pro Val Ala Pro Thr Gln
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 7 amino acids

EP 0 576 842 A2

(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala
1 5

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 9 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala
1 5

30

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 9 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr
1 5

45

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 12 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

50

55

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 9 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

Thr Pro Val Val Lys Gln Glu Val Lys
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 11 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

Val Lys Gln Pro Thr Thr Gln Gln Thr Ala Pro
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 10 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

EP 0 576 842 A2

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

5 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

Ile Lys Gln Pro Thr Lys Thr Val Ala Pro
1 5 10

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 9 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

15 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

Gln Gln Thr Thr Thr Lys Ala Pro Thr
1 5

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 9 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

30 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

35 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

Val Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln
1 5

40 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 12 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

45 (ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

50

55

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala Pro Lys Val Ala
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 11 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

Leu Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 11 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

Gln Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 12 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:

Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys

EP 0 576 842 A2

1

5

10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:15:

5

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 10 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

10

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 - (B) STRAIN: EGD

15

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:15:

Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:16:

20

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 14 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

25

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 - (B) STRAIN: EGD

30

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:16:

Gln Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Glu Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:17:

35

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 12 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (D) TOPOLOGY: linear

40

- (ii) MOLECULE TYPE: peptide

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 - (B) STRAIN: EGD

45

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:17:

Glu Val Lys Gln Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala
1 5 10

50

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:18:

55

5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 12 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
 (B) STRAIN: EGD

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:18:

15 Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr Pro Lys
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 11 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria innocua*

25

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:19:

30 Ser Thr Pro Val Val Lys Gln Glu Val Lys Lys
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 13 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

35

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: *Listeria innocua*

40

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:20:

45 Glu Val Lys Gln Pro Thr Thr Gln Gln Thr Ala Pro Ala
 1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 12 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (D) TOPOLOGY: linear

50

55

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria innocua*

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:21:

Ala Ile Lys Gln Pro Thr Lys Thr Val Ala Pro Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 11 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria innocua*

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:22:

Glu Gln Gln Thr Thr Thr Lys Ala Pro Thr Gln
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 232 amino acids

(B) TYPE: amino acid

(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*

(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:23:

Gln Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Glu Lys Ser Val
1 5 10 15

Ser Ala Thr Trp Leu Asn Val Arg Thr Gly Ala Gly Val Asp Asn Ser
20 25 30

Ile Ile Thr Ser Ile Lys Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Glu Thr Thr
35 40 45

Glu Ser Asn Gly Trp His Lys Ile Thr Tyr Asn Asp Gly Lys Thr Gly
50 55 60

Phe Val Asn Gly Lys Tyr Leu Thr Asp Lys Ala Val Ser Thr Pro Val
65 70 75 80

EP 0 576 842 A2

Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys Glu Thr Thr Thr Gln Gln Ala Ala
85 90 95

Pro Val Ala Glu Thr Lys Thr Glu Val Lys Gln Thr Thr Gln Ala Thr
100 105 110

Thr Pro Ala Pro Lys Val Ala Glu Thr Lys Glu Thr Pro Val Ile Asp
115 120 125

Gln Asn Ala Thr Thr His Ala Val Lys Ser Gly Asp Thr Ile Trp Ala
130 135 140

Leu Ser Val Lys Tyr Gly Val Ser Val Gln Asp Ile Met Ser Trp Asn
145 150 155 160

Asn Leu Ser Ser Ser Ser Ile Tyr Val Gly Gln Lys Leu Ala Ile Lys
165 170 175

Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr Pro Lys Ala Glu Val Lys Thr Glu Ala
180 185 190

Pro Ala Ala Glu Lys Gln Ala Ala Pro Val Val Lys Glu Asn Thr Asn
195 200 205

Thr Asn Thr Ala Thr Thr Glu Lys Lys Glu Thr Ala Thr Gln Gln Gln
210 215 220

Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu
225 230

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:24:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 478 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
(A) ORGANISM: *Listeria monocytogenes*
(B) STRAIN: EGD

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:24:

Met Asn Met Lys Lys Ala Thr Ile Ala Ala Thr Ala Gly Ile Ala Val
1 5 10 15

Thr Ala Phe Ala Ala Pro Thr Ile Ala Ser Ala Ser Thr Val Val Val
20 25 30

Glu Ala Gly Asp Thr Leu Trp Gly Ile Ala Gln Ser Lys Gly Thr Thr
35 40 45

Val Asp Ala Ile Lys Lys Ala Asn Asn Leu Thr Thr Asp Lys Ile Val
50 55 60

Pro Gly Gln Lys Leu Gln Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys
65 70 75 80

EP 0 576 842 A2

Thr Glu Lys Ser Val Ser Ala Thr Trp Leu Asn Val Arg Thr Gly Ala
85 90 95

5 Gly Val Asp Asn Ser Ile Ile Thr Ser Ile Lys Gly Gly Thr Lys Val
100 105 110

Thr Val Glu Thr Thr Glu Ser Asn Gly Trp His Lys Ile Thr Tyr Asn
115 120 125

10 Asp Gly Lys Thr Gly Phe Val Asn Gly Lys Tyr Leu Thr Asp Lys Ala
130 135 140

Val Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys Glu Thr Thr
145 150 155 160

15 Thr Gln Gln Ala Ala Pro Val Ala Glu Thr Lys Thr Glu Val Lys Gln
165 170 175

Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala Pro Lys Val Ala Glu Thr Lys Glu
180 185 190

20 Thr Pro Val Ile Asp Gln Asn Ala Thr Thr His Ala Val Lys Ser Gly
195 200 205

Asp Thr Ile Trp Ala Leu Ser Val Lys Tyr Gly Val Ser Val Gln Asp
210 215 220

25 Ile Met Ser Trp Asn Asn Leu Ser Ser Ser Ser Ile Tyr Val Gly Gln
225 230 235 240

Lys Leu Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr Pro Lys Ala Glu
245 250 255

30 Val Lys Thr Glu Ala Pro Ala Ala Glu Lys Gln Ala Ala Pro Val Val
260 265 270

Lys Glu Asn Thr Asn Thr Asn Thr Ala Thr Thr Glu Lys Lys Glu Thr
275 280 285

35 Ala Thr Gln Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu Ala Ala Lys
290 295 300

Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Asn Thr Asn Ala Asn Lys Thr Asn Thr
305 310 315 320

40 Asn Thr Asn Thr Asn Asn Thr Asn Thr Pro Ser Lys Asn Thr Asn Thr
325 330 335

Asn Ser Asn Thr Asn Thr Asn Thr Asn Ser Asn Thr Asn Ala Asn Gln
340 345 350

45 Gly Ser Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Ser Ala Ser Ala Ile Ile Ala
355 360 365

Glu Ala Gln Lys His Leu Gly Lys Ala Tyr Ser Trp Gly Gly Asn Gly
370 375 380

50 Pro Thr Thr Phe Asp Cys Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Val Phe Ala Lys
385 390 395 400

55

20

- 25

30

35

40

45

50

55

worin

X³ und X⁴ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff, eine beliebige Aminosäure oder ein beliebiges Oligopeptid mit bis zu 7 Aminosäuren bedeuten.

- 5 4. Peptid nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine der in Fig. 2 a-i dargestellten Sequenzen.
5. Peptid nach Anspruch 3, gekennzeichnet durch eine der in Fig. 5 a-d dargestellten Sequenzen.
- 10 6. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 3 - 5 zur Herstellung von immunogenen Konjugaten.
7. Antikörper gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop aus der Sequenz des Polypeptids nach Figur 3 bindet.
- 15 8. Antikörper nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop bindet, welches eine der in Fig. 2 a-i dargestellten Sequenzen enthält.
9. Antikörper, herstellbar durch Immunisierung eines Versuchstieres mit einem Polypeptid nach Figur 3 oder mit einem immunogenen Konjugat, welches ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthält.
- 20 10. Antikörper gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Epitop bindet, welches eine der in Fig. 5 a-d dargestellten Sequenzen enthält.
- 25 11. Antikörper, herstellbar durch Immunisierung eines Versuchstieres mit einem immunogenen Konjugat, welches ein Peptid nach einer der Abbildungen 5 a-d enthält.
12. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gerichtet gegen das Protein p60 aus Listerien, indem man ein Versuchstier mit einem Immunogen immunisiert und den Antikörper isoliert, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein Polypeptid nach Fig. 3 oder ein immunogenes Konjugat, das ein Polypeptid nach Fig. 3 enthält, verwendet.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein immunogenes Konjugat verwendet, das ein Peptid mit 7 bis 24 Aminosäuren ausgewählt aus dem Polypeptid nach Fig. 3 enthält.
- 35 14. Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruches 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Immunogen ein immunogenes Konjugat verwendet, das ein Peptid nach einer der Formeln IVa-IVi aus Anspruch 3 enthält.
- 40 15. Verwendung eines Primers nach einem der Ansprüche 1 - 2 für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.
16. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels Genamplifikation, dadurch gekennzeichnet, daß ein Primer nach einem der Ansprüche 1 - 2 verwendet wird.
- 45 17. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 7-11 für den Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria.
18. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels einer Immunreaktion, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper nach einem der Ansprüche 7-11 verwendet wird.
- 50 19. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria mittels Polymerase-Ketten-Reaktion, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Primer nach einem der Ansprüche 1 - 2 enthalten ist.
- 55 20. Testzusammenstellung nach Anspruch 19 zum Nachweis von Bakterien der Art Listeria monocytogenes.

21. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* mittels Immunoassay, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Antikörper nach einem der Ansprüche 7-9 enthalten ist.
22. Testzusammenstellung zum Nachweis von Bakterien der Art *Listeria innocua* mittels Immunoassay, dadurch gekennzeichnet, daß darin ein Antikörper nach einem der Ansprüche 10-11 enthalten ist.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

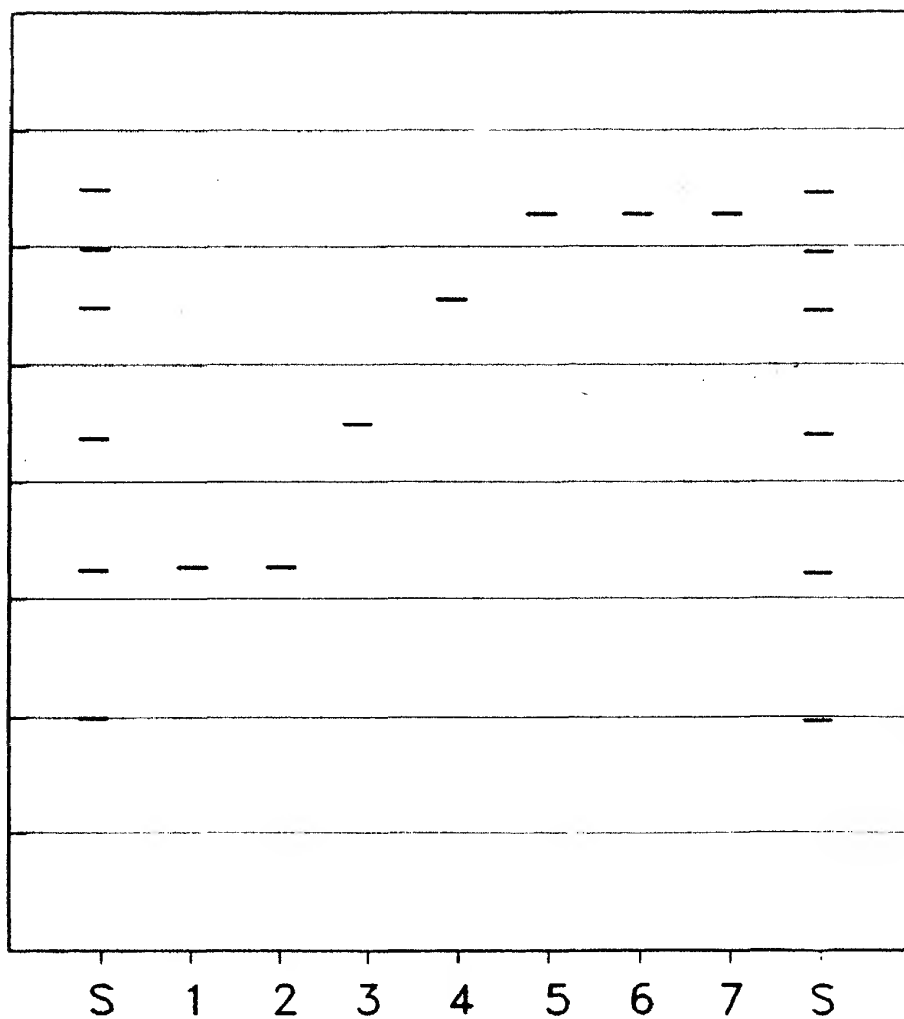


Fig. 2

a:

Val Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln
 1 5

b:

5 Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala Pro Lys Val Ala
 1 5 10

c:

10 Leu Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr
 1 5 10

d:

15 Gln Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu
 1 5 10

e:

Ser Thr Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys
 1 5 10

20 f:

Pro Val Ala Pro Thr Gln Glu Val Lys Lys
 1 5 10

g:

25 Gln Val Asn Asn Glu Val Ala Ala Ala Glu Lys Thr Glu Lys
 1 5 10

h:

30 Glu Val Lys Gln Thr Thr Gln Ala Thr Thr Pro Ala
 1 5 10

i:

35 Ala Ile Lys Gln Thr Ala Asn Thr Ala Thr Pro Lys
 1 5 10

Fig. 3

	Gln	Val	Asn	Asn	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	Thr	Glu	Lys	Ser	Val	
	1				5					10					15		
	Ser	Ala	Thr	Trp	Leu	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Ala	Gly	Val	Asp	Asn	Ser	
				20					25					30			
5	Ile	Ile	Thr	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Thr	
			35					40					45				
	Glu	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	Asp	Gly	Lys	Thr	Gly	
		50					55					60					
10	Phe	Val	Asn	Gly	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asp	Lys	Ala	Val	Ser	Thr	Pro	Val	
	65					70					75				80		
	Ala	Pro	Thr	Gln	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Thr	Thr	Gln	Gln	Ala	Ala	
					85					90					95		
	Pro	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Glu	Val	Lys	Gln	Thr	Thr	Gln	Ala	Thr	
				100					105					110			
15	Thr	Pro	Ala	Pro	Lys	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Glu	Thr	Pro	Val	Ile	Asp	
			115					120					125				
	Gln	Asn	Ala	Thr	Thr	His	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Ile	Trp	Ala	
		130					135					140					
20	Leu	Ser	Val	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Trp	Asn	
	145					150					155					160	
	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Gly	Gln	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	
				165						170					175		
	Gln	Thr	Ala	Asn	Thr	Ala	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Lys	Thr	Glu	Ala	
				180					185					190			
25	Pro	Ala	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Lys	Glu	Asn	Thr	Asn	
			195					200					205				
	Thr	Asn	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Thr	Gln	Gln	Gln	
		210					215					220					
30	Thr	Ala	Pro	Lys	Ala	Pro	Thr	Glu									
	225					230											

35

Fig. 4a

	Met	Asn	Met	Lys	Lys	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ile	Ala	Val	
	1			5					10					15			
	Thr	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	Ser	Thr	Val	Val	Val	
			20					25					30				
5	Glu	Ala	Gly	Asp	Thr	Leu	Trp	Gly	Ile	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Thr	Thr	
		35						40					45				
	Val	Asp	Ala	Ile	Lys	Lys	Ala	Asn	Asn	Leu	Thr	Thr	Asp	Lys	Ile	Val	
		50					55					60					
10	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Gln	Val	Asn	Asn	Glu	Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Lys	
	65				70					75					80		
	Thr	Glu	Lys	Ser	Val	Ser	Ala	Thr	Trp	Leu	Asn	Val	Arg	Thr	Gly	Ala	
				85					90						95		
	Gly	Val	Asp	Asn	Ser	Ile	Ile	Thr	Ser	Ile	Lys	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	
			100					105						110			
15	Thr	Val	Glu	Thr	Thr	Glu	Ser	Asn	Gly	Trp	His	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	
		115						120					125				
	Asp	Gly	Lys	Thr	Gly	Phe	Val	Asn	Gly	Lys	Tyr	Leu	Thr	Asp	Lys	Ala	
		130				135						140					
20	Val	Ser	Thr	Pro	Val	Ala	Pro	Thr	Gln	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Thr	Thr	
	145				150					155					160		
	Thr	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Glu	Val	Lys	Gln	
				165					170					175			
	Thr	Thr	Gln	Ala	Thr	Thr	Pro	Ala	Pro	Lys	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Glu	
			180					185					190				
25	Thr	Pro	Val	Ile	Asp	Gln	Asn	Ala	Thr	Thr	His	Ala	Val	Lys	Ser	Gly	
		195					200						205				
	Asp	Thr	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser	Val	Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Val	Gln	Asp	
	210					215						220					
30	Ile	Met	Ser	Trp	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Gly	Gln	
	225				230					235					240		
	Lys	Leu	Ala	Ile	Lys	Gln	Thr	Ala	Asn	Thr	Ala	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	
				245					250					255			

35

Fig. 4b

	Val Lys Thr Glu Ala Pro Ala Ala Glu Lys Gln Ala Ala Pro Val Val	
	260	265 270
5	Lys Glu Asn Thr Asn Thr Asn Thr Ala Thr Thr Glu Lys Lys Glu Thr	
	275	280 285
	Ala Thr Gln Gln Gln Thr Ala Pro Lys Ala Pro Thr Glu Ala Ala Lys	
	290	295 300
	Pro Ala Pro Ala Pro Ser Thr Asn Thr Asn Ala Asn Lys Thr Asn Thr	
	305	310 315 320
10	Asn Thr Asn Thr Asn Asn Thr Asn Thr Pro Ser Lys Asn Thr Asn Thr	
	325	330 335
	Asn Ser Asn Thr Asn Thr Asn Thr Asn Ser Asn Thr Asn Ala Asn Gln	
	340	345 350
15	Gly Ser Ser Asn Asn Asn Ser Asn Ser Ser Ala Ser Ala Ile Ile Ala	
	355	360 365
	Glu Ala Gln Lys His Leu Gly Lys Ala Tyr Ser Trp Gly Gly Asn Gly	
	370	375 380
	Pro Thr Thr Phe Asp Cys Ser Gly Tyr Thr Lys Tyr Val Phe Ala Lys	
	385	390 395 400
20	Ala Gly Ile Ser Leu Pro Arg Thr Ser Gly Ala Gln Tyr Ala Ser Thr	
	405	410 415
	Thr Arg Ile Ser Glu Ser Gln Ala Lys Pro Gly Asp Leu Val Phe Phe	
	420	425 430
25	Asp Tyr Gly Ser Gly Ile Ser His Val Gly Ile Tyr Val Gly Asn Gly	
	435	440 445
	Gln Met Ile Asn Ala Gln Asp Asn Gly Val Lys Tyr Asp Asn Ile His	
	450	455 460
	Gly Ser Gly Trp Gly Lys Tyr Leu Val Gly Phe Gly Arg Val	
	465	470 475
30		
35		

Fig. 5

a:

5 Ser Thr Pro Val Val Lys Gln Glu Val Lys Lys
1 5 10

b:

10 Glu Val Lys Gln Pro Thr Thr Gln Gln Thr Ala Pro Ala
1 5 10

15 c:

Ala Ile Lys Gln Pro Thr Lys Thr Val Ala Pro Lys
1 5 10

20

d:

Glu Gln Gln Thr Thr Thr Lys Ala Pro Thr Gln
1 5 10

25

30

35



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 576 842 A3**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(1) Anmeldenummer: 93108775.3

(22) Anmeldetag: 01.06.93

(51) Int. Cl.⁵ **C12Q 1/68**, **C07K 15/28**,
G01N 33/569, //(C12Q1/68,
C12R1:01)

(30) Priorität: 11.06.92 DE 4219111
25.11.92 DE 4239567

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.01.94 Patentblatt 94/01

(84) Benannte Vertragsstaaten:
BE CH DE FR GB IT LI NL

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten
Recherchenberichts: 23.11.94 Patentblatt 94/47

(71) Anmelder: MERCK PATENT GmbH
Postfach,
Frankfurter Strasse 250
D-64271 Darmstadt (DE)

(72) Erfinder: Goebel, Werner, Prof.Dr.
Ravensburgstrasse 2B
W-8707 Veitshöchheim (DE)
Erfinder: Bubert, Andreas
Am Happach 34
W-8708 Gerbrunn (DE)
Erfinder: Köhler, Stefan, Dr.
394 Avenue Du Belvedere
F-34980 St. Clément (FR)
Erfinder: Pawelzik, Martina, Dr.
Gustav-Heinemann-Ring 57
D-81739 München (DE)
Erfinder: Hofmann, Gottfried, Dr.
Graupnerweg 53
W-6100 Darmstadt (DE)
Erfinder: Neumann, Siegfried, Dr.
Battenbergstrasse 11
W-6100 Seeheim-Jugenheim (DE)
Erfinder: Schubert, Peter, Dr.
Jahnstrasse 127
W-6100 Darmstadt (DE)
Erfinder: Linxweiler, Winfried, Dr.
Bahnhofstrasse 48
W-6114 Gross-Umstadt (DE)
Erfinder: Burger, Christa, Dr.
Jahnstrasse 124
W-6100 Darmstadt (DE)

(54) Verfahren und Mittel zum Nachweis von Listerien.

(57) Die Erfindung betrifft Mittel und Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Listeria, insbesondere von L. monocytogenes. Zu den erfindungsgemäßen Mitteln gehören Primer, deren Sequenz aus dem iap-Gen von L. monocytogenes ausgewählt ist. Weiterhin gehören zu den erfindungsgemäßen Mitteln Peptide, deren Sequenz aus dem p60-Protein

ausgewählt ist, und die geeignet sind, spezifische Antikörper für den immunologischen Nachweis von L. monocytogenes zu erzeugen.

EP 0 576 842 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 10 8775

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.5)
D,X	INFECTION AND IMMUNITY, Bd.58, Nr.5, Mai 1990 Seiten 1943 - 1950 K ² H ² LER ET AL. 'The gene coding for protein p60 of Listeria monocytogenes' * Seite 1949, linke Spalte; Abbildung 3 *	1-6, 15, 16, 19, 20	C12Q1/68 C07K15/28 G01N33/569 /(C12Q1/68, C12R1:01)
D,Y	---	7-14, 17, 18, 21, 22	
Y	WO-A-90 10870 (CORNELL RESEARCH FOUNDATION) * Zusammenfassung *	7-14, 17, 18, 21, 22	
D,A	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd.54, Nr.12, Dezember 1988, WASHINGTON, DC Seiten 2933 - 2937 DATTA ET AL. 'Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes' * das ganze Dokument *	1-6, 15, 16, 19, 20	
D,A	LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, Bd.11, 1990, OXFORD Seiten 158 - 162 BORDER ET AL. 'Detection of Listeria species' * das ganze Dokument *	1-6, 15, 16, 19, 20	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.5) C12Q C07K G01N
A	FR-A-2 616 804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) * das ganze Dokument *	1, 2, 15, 16, 19, 20	

-/--			
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort	Abschließdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	1. September 1994	Ceder, O	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument * : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			

EPO FORM 1503 (03.92) (Pw/CB)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 93 10 8775

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)
P, X	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 8, August 1992, WASHINGTON, DC. Seiten 2625 - 2632 BUBERT ET AL. 'The homologous and heterologous regions within the iap gene allow' * das ganze Dokument * -----	1-6	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abchlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	1. September 1994	Ceder, O	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

EPO FORM 150 (03.82) (POM/CO)